

主論文の要約

論文題目 ブドウにおける二次代謝産物蓄積機構解明に向けた
PDR 型 ABC トランスポーターの解析およびマルチオミクス

氏名 鈴木 真実

論文内容の要約

ブドウ (*Vitis vinifera* L.) は、生食用として、また醸造の原料として、世界中で栽培されている重要な作物の一つである。ブドウの果皮には、アントシアニン、レスベラトロール、カテキンなど多種多様な二次代謝産物が豊富に含まれている。これらは、果実やワインの色や味を決定するだけでなく、機能性成分としても働くことから、果実品質を決定する重要な要素である。このため、これら二次代謝産物の蓄積を理解することは、高品質なブドウの育種や栽培のために重要である。

ブドウは 2007 年に園芸作物としては初めてゲノムが解読された。しかし、ゲノム解読当初はアSEMBL などのゲノム情報の整備が荒く、アノテーションの付与もほとんど行われていなかった。2012 年になり情報量が増加しアSEMBL 方法が改善された 12X version 1 が発表され、全遺伝子を対象としたマイクロアレイも設計・販売されるなど、ようやく多くの研究者が利用しやすいように改善されつつある。今まさにブドウのゲノム情報を活用した研究が脚光を浴び、加速している。

一方、植物分野においても生体中に存在するタンパク質や代謝産物を網羅的に研究するオミクスの発展が目覚ましい。またこれらのオミクスを複数種実施し、データを統合して形質や表現型を考察するマルチオミクスを行うことで、生命現象の理解をより深めることができるようになった。園芸作物については、オミクスはまだ始まったばかりである。本研究では、ブドウの果皮における二次代謝産物蓄積機構の解明のために、ゲノム情報やオミクスを利用した解析を行った。

第二章では、二次代謝産物の輸送に働く ABC トランスポーターに着目した。ゲノム情報をもとに、主要なサブファミリーであるフルサイズ ABCG (PDR) サブファミリーの全分子種を検索し、32 種を見出した。それらのうち、レスベラトロールが蓄積するエリシター処理で遺伝子発現が増加したことが報告されている VvABCG44 にターゲットをしばり、ブドウ果皮の RNA を用いて VvABCG44 の全長 cDNA のクローニングを行った。VvABCG44 の遺伝子の発現解析を行ったところ、葉で高い発現が確認された。また、果皮に紫外線を照射すると、レスベラトロールの蓄積や、レスベラトロール合成の鍵酵素である STS の発現とともに、VvABCG44 の発現が誘導され

た。この結果から、VvABCG44 はレスベラトロールの蓄積に関与することが示唆された。

第三章では、果皮に紫外線を照射したときの代謝変化に着目し、トランスクリプトーム解析とメタボローム解析の両方を組み合わせたマルチオミクスを実施した。まず、ブドウの全遺伝子を搭載したマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。ブドウの遺伝子に情報を付与するために、複数のデータベースを検索して機能を推定したほか、Gene Ontology (GO) の付与を行った。マイクロアレイ解析の結果について、GO エンリッチメント解析を行ったところ、紫外線で特異的に発現が誘導される GO タームを Biological process で 2 種、Molecular function で 11 種得た。それらの中にはレスベラトロール合成の鍵酵素である stilbene synthase (STS) を示すターム trihydroxystilbene synthase activity が含まれていた。また同じサンプルを用い、LC-QTOF-MS を使用したメタボローム解析を行い、2,012 種の代謝産物ピークを得た。これらの中から、主成分分析 (PCA) により紫外線照射区に特有の代謝産物を抽出したところ、標品との照合からこの代謝産物がレスベラトロールであることが同定された。ブドウの KEGG システムの遺伝子情報が、ブドウゲノム情報 12X version1 に基づいていなかったため、この情報を更新し、さらに代謝マップを描画するためのウェブツール KaPPA-View 4 KEGG のシステムを更新した。更新した KaPPA-View 4 KEGG により、両データを一つの代謝マップに統合したところ、ブドウ果皮に紫外線を照射することにより、レスベラトロール代謝系が他の代謝系に比べて際立って誘導されることが明確に示された。

第四章では、果実成長における成熟への転換点 (ベレーゾン) 前後に蓄積する二次代謝産物に着目し、LC-QTOF-MS によるメタボローム解析により、その蓄積傾向を確認した。ポジティブモードにおいて未同定ピークを含む 1,197 種の代謝産物ピークを検出した。そのうち主要なフェノール性化合物 12 種を標品で同定・定量した。成熟時にはカテキンを除くフェノール性化合物のほとんどが増加しており、特にアントシアニン的一种であるマルビジン 3 グルコシドの蓄積量が最も多かった。一方、カテキンの蓄積量はベレーゾン前に多く、成熟時に減少した。検出した 1,197 種の代謝産物ピークを用いて PCA を実施したところ、成熟に関わる代謝産物 7 種を見出した。7 種のうち未同定代謝産物について MS/MS フラグメントをもとにデータベースと照合したところ、果実やワインの旨味に関わるアミノ酸であると推定された。

本研究で、ブドウの二次代謝産物のうちレスベラトロール蓄積を誘導する紫外線照射を行い、マルチオミクスでその代謝変化の詳細をプロファイルすることに成功し、レスベラトロール合成経路が特異的に誘導されることを明確に示すことができた。また第二章で着目した VvABCG44 をはじめ、レスベラトロールの輸送体の候補を見つけることができた。本研究においては、ブドウの KEGG システムと KaPPA-View 4 KEGG システムの更新や MS/MS フラグメントのデータから代謝産物を推定する作業も実施し、今後の園芸作物のオミクス研究の発展に貢献できるツールや手法を提案することができた。